



Análisis de la transición epitelio-mesénquima en un modelo patológico de células de epitelio pigmentario humanas para degeneración macular asociada a la edad (DMAE)

Analysis of the epithelial-mesenchymal transition in a pathological model of human retinal pigment epithelial cells for age-related macular degeneration (AMD)

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

Autor: VÍCTOR ÁLVARO SÁNCHEZ

Salamanca, Junio 2019

Analysis of the epithelial-mesenchymal transition in a pathological model of human retinal pigment epithelial cells for age-related macular degeneration (AMD)

Abstract

The retinal pigment epithelium (RPE) is a monolayer of polarized cells that constitutes a barrier between photoreceptor cells of the neural retina and the choroidal blood capillaries, the so-called blood-retinal barrier. These cells play a critical role in the maintenance of retinal homeostasis and visual function. Therefore, damage in this cellular layer may cause several pathologies such as age-related macular degeneration (AMD). In AMD, the damage in the RPE cells leads to photoreceptor degeneration, causing a partial or total vision loss. The molecular mechanisms involved in the early stages of the disease are still unknown, but the available studies suggest that RPE cells may undergo an epithelial-mesenchymal transition triggered by the pathological environment; thus, promoting the progression of the disease. To test this hypothesis, in the present study we have performed a protein analysis of human retinal pigment epithelial cell cultures, treated with serum from patients with AMD. The protein markers used in the analysis were first tested, classified and selected by using them to characterize the developmental process of the epithelial cell culture at 7, 14 and 21 days. The results achieved in this study are consistent with the suggested phenotypic change, but they should be considered as preliminary data that must be complemented with additional experiments.

Índice

1.	Introducción.....	1
1.1.	Epitelio pigmentario de la retina.....	1
1.2.	Degeneración Macular Asociada a la Edad	3
1.3.	Transición epitelio-mesénquima (TEM)	5
2.	Justificación y objetivo	8
3.	Materiales y métodos	9
4.	Resultados	12
	Estudios en cultivos celulares a 7, 14 y 21 días	13
	Estudios con sueros de pacientes con DMAE.....	18
5.	Discusión.....	20
	Estudios en cultivos celulares a 7, 14 y 21 días	20
	Estudios con sueros de pacientes con DMAE.....	25
6.	Conclusiones	28
7.	Bibliografía.....	29

1. Introducción

El órgano encargado de la visión es el ojo. Se trata de un proceso sensorial complejo que comienza con la entrada de la luz a través de la pupila. Esta luz atraviesa el cristalino, que actúa como una lente y la enfoca sobre la retina, la región sensorial, pues en ella tiene lugar la conversión de la señal luminosa en señales eléctricas que llegan a la corteza visual, donde se procesa la información.

La retina se localiza en la parte posterior del globo ocular y forma parte del sistema nervioso central. En ella podemos diferenciar dos regiones, el epitelio pigmentario y la retina neural; entre ambas se localiza el espacio subretiniano, donde se alojan los segmentos externos de los fotorreceptores, que contienen los pigmentos fotosensibles implicados en la visión. En estos fotorreceptores (conos y bastones) tiene lugar la fototransducción como consecuencia de la llegada del estímulo luminoso. A continuación, los receptores establecen sinapsis con las células bipolares de la retina y éstas con las células ganglionares, que extienden sus prolongaciones formando el nervio óptico, a través del cual llega la información visual al cerebro.

Además de estas células encontramos interneuronas y células gliales como las células de Müller. Para mantener esta estructura y la fisiología de la retina, resulta esencial el epitelio pigmentario^{1,2} (Figura 1).

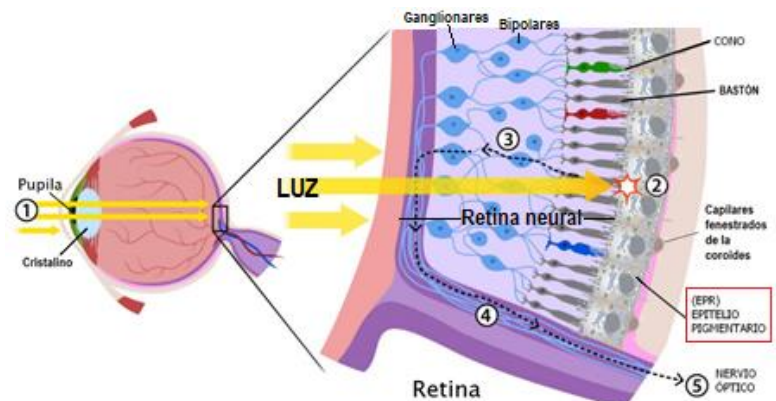


Figura 1. Esquema del proceso de la visión y de la retina. Modificado de³.

1.1. Epitelio pigmentario de la retina

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa de células hexagonales pigmentadas que forma una barrera entre la sangre y la retina, la barrera hematorretiniana⁴. Se trata de una capa de células polarizadas en las que la membrana apical contacta con el espacio subretinal¹ y presenta microvellosidades alargadas que rodean al segmento externo de los fotorreceptores, mientras que la membrana basal contacta con la membrana de Bruch, barrera semipermeable de tejido conectivo rico en colágeno y elastina⁵, que separa el epitelio pigmentario de los capilares fenestrados de la coroides. Esta membrana basal presenta pliegues profundos que contribuyen a aumentar el área superficial de esta región, lo que permite conseguir una mayor capacidad de absorción y secreción⁶⁻⁸.

La polaridad apicobasal de estas células se refleja en la distinta composición lipídica y proteica, así como en la distribución asimétrica de orgánulos, canales iónicos, transportadores, bombas y receptores^{6,7} (Figura 2.A). Las uniones intercelulares también se encuentran repartidas de manera desigual y la integridad de la barrera epitelial depende de su formación^{9,10} (Figura 2.B).

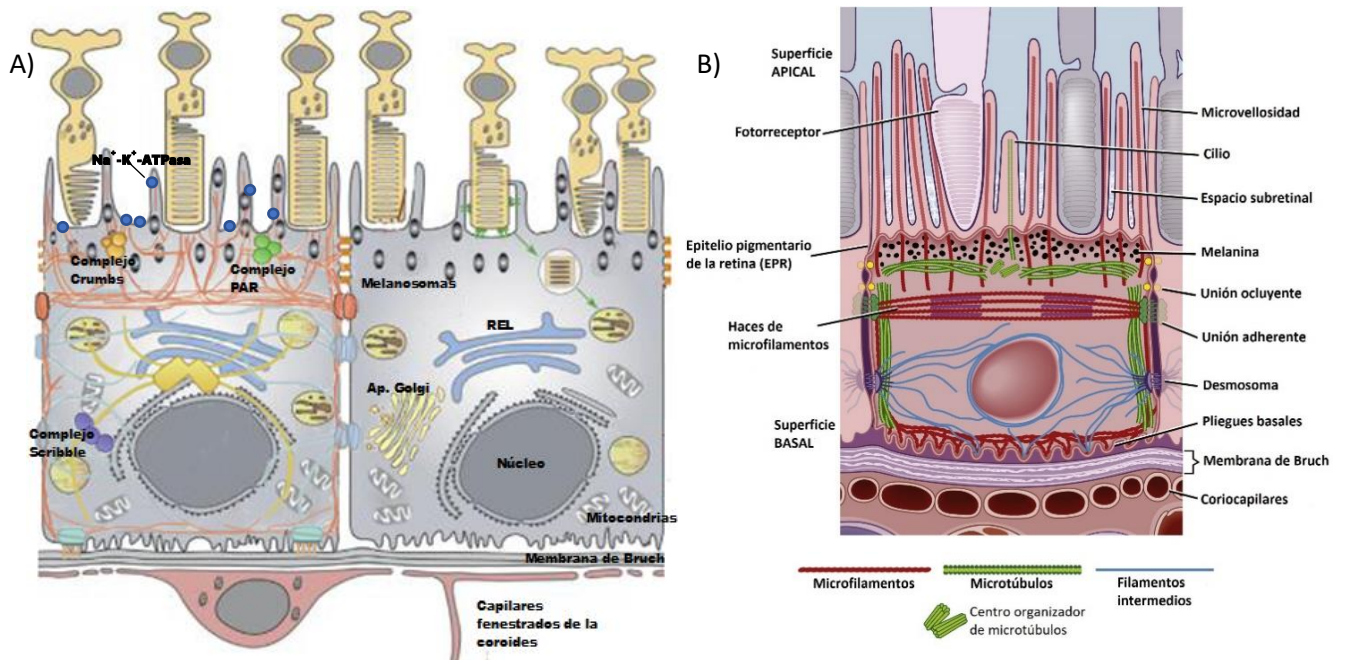


Figura 2. Esquemas de la estructura de las células polarizadas del EPR. A) Distribución asimétrica de componentes celulares. El retículo endoplasmático liso (REL), los melanosomas y la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa se localizan en la región apical y el núcleo, el aparato de Golgi y las mitocondrias, en posición basal^{11,12}. Los complejos de polaridad interaccionan entre sí y con proteínas asociadas al citoesqueleto, lo que permite modular el dinámico citoesqueleto de actina, uno de los elementos clave en el control de la forma y polaridad celular. También interaccionan con el tráfico intracelular de membranas^{13,14}. Modificado de⁷. B) Las uniones intercelulares. De más apical a más basal están las uniones ocluyentes, que contribuyen a bloquear la libre difusión de sustancias entre los espacios paracelulares (transporte controlado por mecanismos activos); uniones adherentes (zónula adherente o anillo de adhesión)¹¹, que junto con las anteriores reconocen señales para controlar tamaño, forma y proliferación celular; desmosomas, y uniones GAP, que permiten un paso rápido de información entre células⁹. También hay hemidesmosomas basales¹⁰. Pueden presentar un cilio apical⁸. Modificado de⁸.

La polaridad apicobasal depende de 3 complejos proteicos funcionalmente asociados a la arquitectura de las uniones celulares y al citoesqueleto, que son el complejo Crumbs, el complejo Par y el complejo Scribble^{15,16}. El complejo Crumbs lo componen PALS1, PATJ y las proteínas CRB (CRB1, 2 y 3 en mamíferos, aunque no todas se expresan en todos los tipos celulares¹⁶); participa en la regulación del metabolismo, el tamaño y la supervivencia celular. El complejo Par está formado por las proteínas PAR3, PAR6 y aPKC y está implicado en la migración celular polarizada. Y el complejo Scribble está formado por las proteínas Scrib, Dlg y Lgl e interviene en la regulación negativa de la proliferación celular. No obstante, en términos de polaridad, el complejo Crumbs y el complejo Par participan en el reconocimiento de las señales iniciales de polarización y en el mantenimiento y establecimiento (respectivamente) de la región apical y son esenciales para la formación de los complejos de unión. Por su parte, el complejo Scribble está implicado en la definición de la identidad basolateral. Por eso los dos primeros quedan restringidos a la región apical mientras que el complejo Scribble se localiza en la membrana lateral^{13,14,17} (Figura 2.A).

Todo esto influye en la funcionalidad del epitelio. El EPR presenta numerosas funciones⁶:

- 1) **Mantenimiento de la fisiología de la retina:** la retina es una estructura muy expuesta a la fotooxidación⁹ por lo que el EPR presenta 3 líneas de defensa: la presencia de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, la capacidad fisiológica de las células para reparar daños en DNA, lípidos y proteínas, y la presencia de pigmentos capaces de absorber luz de distintas longitudes de onda entre los que destaca la melanina, localizada en melanosomas apicales¹⁸ que pigmentan el epitelio, de ahí su nombre.
- 2) **Ciclo visual:** el EPR lleva a cabo la reisomerización del *trans*-retinal a 11-*cis*-retinal, grupo prostético que se une a opsinas formando las proteínas fotosensibles de los fotorreceptores y que cambia de conformación como consecuencia de la absorción de la luz, desencadenando la transducción del estímulo en impulsos eléctricos¹².
- 3) **Transporte transepitelial** de electrolitos, agua y productos metabólicos desde el espacio subretinal a la sangre; y de glucosa, retinol y otros nutrientes, desde la sangre a los fotorreceptores⁷.
- 4) **Fagocitosis** de los segmentos externos de los fotorreceptores, sometidos a un gran estrés oxidativo y luminoso, lo que requiere su renovación continua. Cada célula del EPR proporciona **soporte** a entre 30 y 50 fotorreceptores adyacentes⁷.
- 5) **Secreción** de factores de crecimiento, inmunosupresores y neuroprotectores.

Por tanto, esta monocapa es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de la retina, de manera que la alteración de alguna de estas funciones puede provocar la degeneración de la retina, la pérdida de la función visual y hasta la ceguera^{6,7}. Una de las patologías asociadas a disfunciones del EPR es la degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

1.2. Degeneración Macular Asociada a la Edad

La DMAE es la causa más común de ceguera en los países industrializados^{6,19} y la principal causa de pérdida de visión o ceguera entre las personas mayores¹ (50 años o más)²⁰. Afecta a la mácula, que se localiza en la parte temporal del disco óptico. La mácula ocupa el 4% de la superficie total de la retina y presenta una pequeña zona central dominada por conos llamada fovea, rodeada de una región dominada por bastones, la parafovea⁵. La mácula es responsable de gran parte de la visión pues representa casi el 10% de todo el campo visual, concretamente de la visión central y la agudeza visual, de manera que una lesión en esta región puede tener gran impacto en la función visual^{1,19}.

Se trata de una patología de origen multifactorial cuya prevalencia aumenta considerablemente con la edad, por lo que presenta una incidencia en aumento debido al incremento de la esperanza de vida^{11,20}. No obstante, se han identificado otros factores de riesgo además de la edad, como son el historial familiar de la patología, el tabaco o deficiencias nutricionales severas como la baja toma de antioxidantes y zinc^{1,19,21}. Asimismo, es más frecuente en la raza blanca¹⁹ y en las mujeres²¹.

Con la edad comienzan a depositarse detritos entre el EPR y la membrana de Bruch (MB) o en la propia membrana de Bruch. Se trata de depósitos acelulares y desechos metabólicos como lipoproteínas y otros materiales hidrofóbicos, que podrían ser consecuencia de una degradación incompleta de productos metabólicos por parte del EPR. Estos depósitos reciben el nombre de drusas⁶. Las drusas son normales con la edad, pero una presencia excesiva de éstas provoca un daño en la retina, como es el caso de la DMAE²⁰. Se distinguen dos formas clínicas de DMAE (*Figura 3*):

- **No exudativa, “seca” o atrófica:** comienza con una alteración de los pigmentos del epitelio y la aparición de drusas de pequeño-mediano tamaño entre el EPR y la MB^{1,19,20}. En estos estados iniciales la enfermedad es asintomática²¹, pero cuando las drusas comienzan a aumentar en número y tamaño, forman una barrera entre los vasos sanguíneos y el EPR, que provoca la reducción del suplemento de oxígeno y nutrientes, conduciendo a la degeneración de los fotorreceptores adyacentes y a una atrofia que se extiende por el centro de la mácula⁶. La historia clínica de la DMAE “seca” es progresiva e implica una pérdida de visión gradual que puede alargarse durante varios años, pudiendo llegar a producir ceguera¹.
- **Exudativa, “húmeda” o neovascular:** la hipoxia provocada por la acumulación de drusas, reduce la secreción del factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEDF) que es un factor antiangiogénico⁶. A esto hay que añadir la consecuente respuesta inflamatoria, que provoca un aumento de la expresión de citoquinas angiogénicas (como el factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF)²⁰, lo que conduce al desarrollo de una neovascularización de la coroides a partir de los coriocapilares; se forman nuevos vasos sanguíneos inmaduros²¹ que progresan desde la coroides hacia la retina y se extienden a través de la MB. La permeabilidad vascular y la fragilidad²⁰ es mayor en estos vasos inmaduros lo que provoca la aparición de fluidos y/o sangre en el espacio subretinal^{1,22}.

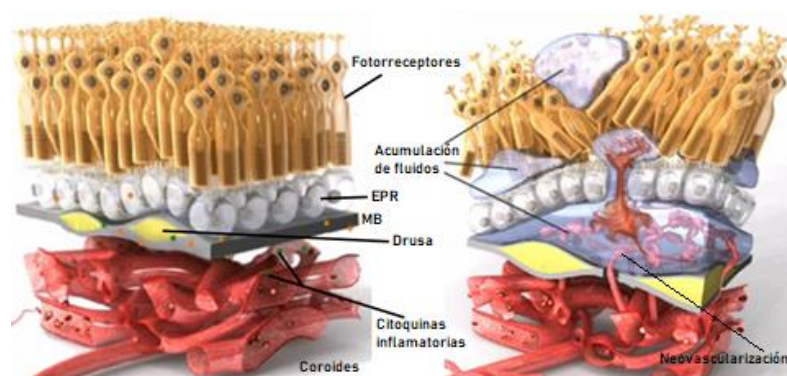


Figura 3. Esquemas DMAE seca y DMAE húmeda. La aparición de drusas provoca la atrofia de los fotorreceptores adyacentes en la DMAE seca (~85-90% de los casos de DMAE)¹¹. El daño puede provocar una respuesta inflamatoria que deriva en una DMAE húmeda (solo el 10-15% de los casos)¹ o ésta puede aparecer abruptamente y rápidamente progresar hacia estados de ceguera. Esta forma neovascular se caracteriza por la presencia de infiltrados sanguíneos y presenta menor prevalencia (10-15%), pero es responsable del 80% de los casos de pérdida visual severa o ceguera^{20,21}. Modificado de²³.

La mayor parte de la investigación y, por tanto, la mayoría de los tratamientos, se han centrado en las fases finales de la enfermedad, cuando está muy desarrollada. Sin embargo, pocos estudios abordan su inicio y progresión, lo que permitiría la monitorización y el tratamiento desde los primeros estadios. De ahí el interés de nuestro trabajo. A pesar de que los mecanismos implicados en estas etapas iniciales no son completamente conocidos, la mayoría de los signos clínicos más tempranos y los cambios histopatológicos ocurren en el EPR¹.

En el laboratorio donde he realizado este TFG se piensa que en estas etapas iniciales podría ocurrir algo similar a lo que sucede en otras complicaciones oculares fibróticas en las que se ve afectado el EPR como es el caso de la vitreorretinopatía proliferativa. En esta patología se cree que hay células del epitelio pigmentario que sufren un proceso de transición epitelio-mesénquima adoptando un fenotipo fibroblástico. Estas células fibroblásticas estarían implicadas en el proceso fibrótico que conduce a la pérdida de visión¹⁸.

1.3. Transición epitelio-mesénquima (TEM)

La transición epitelio-mesénquima es un proceso biológico en el que las células epiteliales sufren múltiples cambios que les permiten adquirir, de manera temporal, un fenotipo celular mesenquimal^{10,24}. Las células epiteliales son células polarizadas que se caracterizan por la presencia de contactos intercelulares muy desarrollados. En la región apical destacan las uniones ocluyentes y en la región lateral, uniones adherentes y desmosomas. Estas células polarizadas descansan sobre la membrana basal, formada por una compleja red de matriz extracelular, con la que contactan mediante integrinas basales²⁵. Todas estas uniones tienen un papel esencial en el mantenimiento de la integridad del epitelio¹⁸. Por el contrario, las células mesenquimales apenas presentan uniones intercelulares, solamente algunos complejos de adhesión que, junto con la polarización trasero-delantera, permiten una migración direccional¹⁵. Se caracterizan por exhibir una capacidad migratoria y de proliferación potenciadas, invasividad, elevada resistencia a senescencia y apoptosis, y un gran incremento de la producción y capacidad de degradación de componentes de la matriz extracelular^{15,18,24}.

La TEM conduce a la desestabilización de las uniones célula-célula y de la maquinaria que controla la polaridad celular, provocando la transformación de las células epiteliales caracterizadas por una morfología cúbica/prismática, en un fenotipo mesenquimal y móvil con forma de huso²⁶. Primero se desestructuran las uniones ocluyentes y después las adherentes y los desmosomas, conduciendo a la separación de las células del epitelio. Finalmente se reprime la transcripción de las proteínas que las forman y la TEM se completa con la degradación de la membrana basal^{24,25}. Se suele hablar de una primera etapa de células no migratorias, una segunda etapa de células premigratorias y una última etapa de células migratorias¹⁰ (*Figura 4*).

El hecho de utilizar el término transición es debido a su carácter reversible. El proceso reverso, la transición mesénquima-epitelio (TME), implica la conversión de células mesenquimales en sus derivados epiteliales gracias a una remodelación dinámica y eficiente de los complejos de adhesión celular^{24,25}.

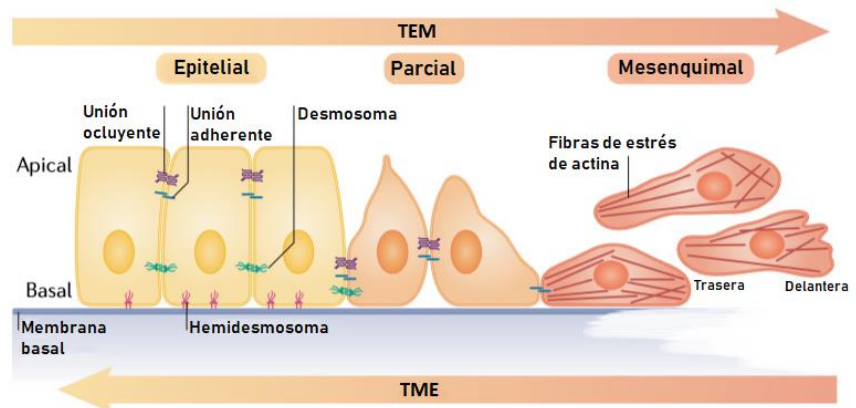


Figura 4. Esquema de la transición epitelio-mesénquima (TEM) y del proceso reverso (TME). Se trata de procesos graduales, con estados intermedios hasta que se adquiere el nuevo fenotipo celular²⁴. Modificado de²⁷.

La transición epitelio-mesénquima participa en diversos procesos biológicos con diferentes consecuencias en cada uno de ellos, aunque en cualquiera de los casos, la finalidad consiste en la generación de células móviles con fenotipo mesenquimal²⁴:

- El primero de ellos se relaciona con la embriogénesis y la organogénesis. En este caso, el proceso de transición epitelio-mesénquima es capaz de generar diversos tipos celulares que comparten un fenotipo mesenquimal. Este “**tipo 1**” de TEM simplemente genera células mesenquimales (mesénquima primario) con potencial para generar un epitelio secundario. Atiende a la necesidad de remodelar y diversificar los tejidos para conseguir una morfogénesis adecuada y generar un organismo funcional. Se trata de una TEM transitoria.
- La TEM “**tipo 3**” es la más estudiada y ocurre en las células neoplásicas, que previamente han sufrido cambios genéticos y epigenéticos en genes que favorecen el crecimiento clonal y el desarrollo de tumores; se trata de cambios que implican la activación de oncogenes y/o la represión de genes supresores de tumores. Estas células cancerígenas que sufren este tipo de TEM son capaces de invadir otras zonas del organismo, permitiendo la progresión del cáncer y la metástasis. Se trata de una adaptación patológica del proceso de transición^{10,26}.
- El proceso biológico que más nos interesa en este trabajo se asocia con la TEM “**tipo 2**”. Este tipo de transición epitelio-mesénquima se relaciona con la curación de heridas, la regeneración tisular y los procesos de fibrosis. En este caso, el programa se desencadena en base a un evento asociado a reparación tisular, que generalmente genera fibroblastos y otras células relacionadas, para reconstruir los tejidos que han sufrido un daño o una herida inflamatoria. La transición no cesa hasta que no disminuye la inflamación. Sin embargo, en el caso de la fibrosis, la TEM continúa puesto que la inflamación se mantiene, conduciendo eventualmente a la destrucción del órgano.

Cuando se produce un daño en un tejido, como puede ser una herida, una infección o una situación de hipoxia, se desencadena una respuesta inflamatoria persistente que tiene como objetivo la eliminación del daño y la reparación del tejido. En este proceso biológico participan células inflamatorias y fibroblastos que liberan señales inflamatorias y componentes de la matriz extracelular como colágeno, lamininas y elastina, que van a participar en el proceso de fibrosis. Cuando el daño ocurre en diversos tejidos epiteliales, esta situación fisiológica desencadena la transición epitelio-mesénquima. Las células comienzan a expresar algunos marcadores mesenquimales y mantienen algunos de los epiteliales, al tiempo que empieza a degradarse la membrana basal¹⁰. Estas células comienzan a separarse del epitelio, atraviesan la membrana basal y se acumulan en el intersticio del tejido, gracias al gradiente de factores de crecimiento y moléculas quimioatrayentes liberados como consecuencia del proceso inflamatorio asociado al daño tisular. Es en este intersticio donde finalmente pierden todos los marcadores epiteliales y consiguen un fenotipo fibroblástico (mesenquimal) completo. Además, se cree que este proceso también ocurre en algunas células endoteliales del entorno vascular asociado al tejido dañado (transición endotelio-mesénquima).

En esta transición participan multitud de procesos moleculares distintos, entre ellos, la activación de factores de transcripción, la expresión de proteínas específicas de la superficie celular, la reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto, la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular y cambios en la expresión de miRNAs específicos. Estos cambios conducen a la pérdida del eje de polaridad apicobasal, a la disociación de complejos de unión y al cambio en el perfil de expresión proteica y génica¹⁷. Todo ello controlado por cascadas de señalización que convergen entre sí, desencadenando la TEM, proceso que muestra una plasticidad inherente al fenotipo epitelial¹⁵. En muchos casos, los factores implicados en el proceso se usan como marcadores para demostrar que las células atraviesan por un proceso de TEM²⁴.

En la literatura, los marcadores más usados para su estudio son marcadores epiteliales como E-cadherina, citoqueratinas (CK19, CK18 y CK8), ocludina, ZO-1, claudinas o mucina-1, que disminuirían en la transición epitelio-mesénquima; y marcadores mesenquimales como vimentina, N-cadherina, α -Smooth Muscle Actin (α -SMA), fibronectina, vitronectina o el factor de transcripción Snail, que aumentarían^{10,26,28}.

Para este estudio se han seleccionado algunos de los anteriores junto con proteínas que forman parte de complejos de polaridad como Scrib, CRB2 y CRB3.

2. Justificación y objetivo

Este trabajo surge de la **hipótesis** de que el proceso de transición epitelio-mesénquima podría estar implicado en el inicio y la progresión de la degeneración macular asociada a la edad, al producirse un daño en el epitelio pigmentario de la retina como consecuencia de la aparición de las drusas.

El **objetivo** del trabajo se centra en buscar expresiones proteicas diferenciales entre células humanas de epitelio pigmentario cultivadas durante 7, 14 y 21 días, de manera que podamos establecer marcadores que nos permitan caracterizar células epiteliales completamente desarrolladas (cultivos celulares de 21 días) y estadios celulares intermedios en los que las células presentan mayor movilidad y aún no tienen definida la polaridad que caracteriza al epitelio (cultivos celulares de 7 y 14 días). La selección de estos marcadores, permitirá su utilización en el estudio del proceso que ocurre al tratar cultivos celulares de epitelio pigmentario de retina completamente desarrollados (21 días) con sueros de pacientes con DMAE. La finalidad del estudio es determinar si las células del epitelio pigmentario atraviesan por un proceso de transición epitelio-mesénquima que participa en el desarrollo de la DMAE, como consecuencia de la exposición del epitelio pigmentario al entorno patológico de la enfermedad.

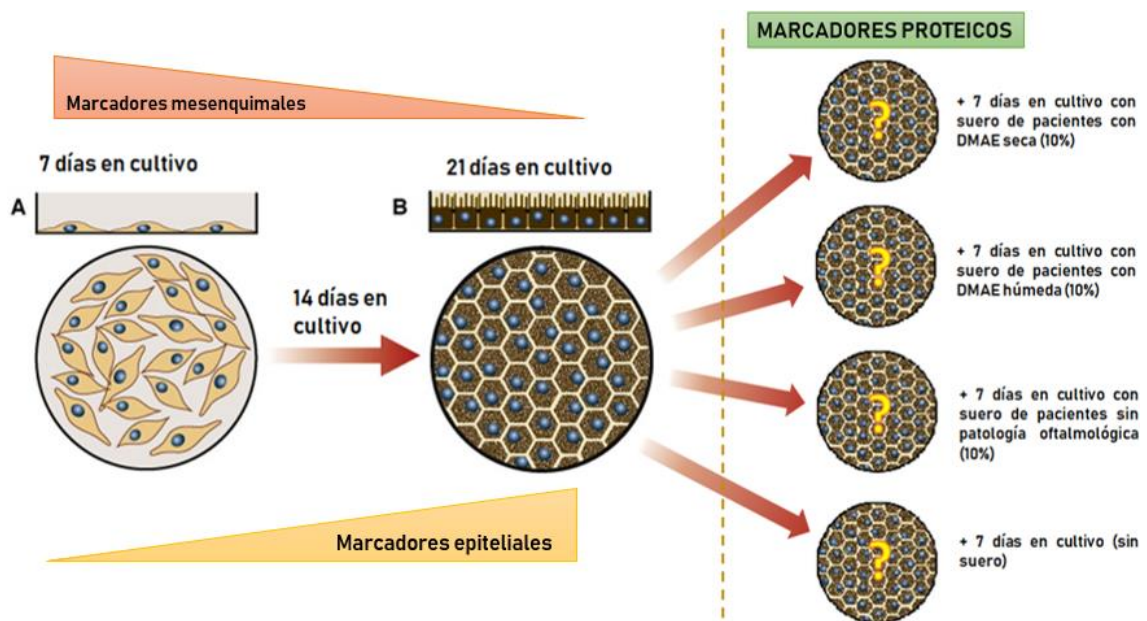


Figura 5. Esquema del trabajo experimental. El objetivo es determinar en cultivos celulares de EPR de 7, 14 y 21 días, marcadores epiteliales y mesenquimales para utilizarlos como marcadores proteicos en el estudio de los cambios morfológicos y moleculares de las células de EPR humanas tratadas con suero de pacientes con DMAE (utilizaremos pacientes control sin ninguna patología oftalmológica degenerativa y células control sin suero). Esquema realizado a partir de una imagen adaptada²⁹.

3. Materiales y métodos

Con el objetivo de observar diferencias en la expresión proteica de células de epitelio pigmentario de la retina humana en cultivo, se realizaron una serie de experimentos de Western blot (WB). El WB es una técnica analítica que permite la detección y cuantificación de las proteínas presentes en una muestra. Consta de 3 etapas que son: la electroforesis o separación de las proteínas en un gel, la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF y la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios adecuados para la detección de las proteínas de interés. El protocolo de WB se puso a punto para adaptarlo a 3 días de trabajo.

1. Obtención y preparación de las muestras de proteínas

Se utilizaron proteínas extraídas de cultivos de células de epitelio pigmentario humano “Clonetics™ Human EPR cells”, de la casa comercial LONZA. Estas células se cultivaron en cestas Transwell® con una membrana de poliéster y un tamaño de poro de 4µm (Costar®) con los medios de cultivo y condiciones adecuadas³⁰ durante 7, 14 y 21 días (*Figura 6*).

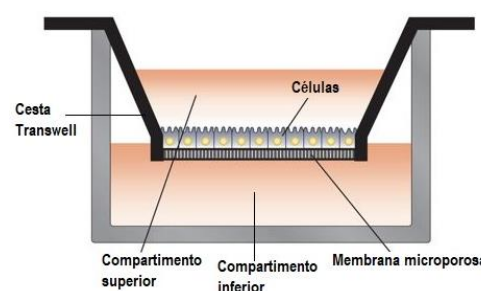


Figura 6. Esquema de cultivo en cestas Transwell. Modificado de¹³.

Para los estudios de DMAE, se cultivaron células durante 21 días de la misma forma que en el caso anterior y, a partir del día 21, se cultivaron 7 días más en presencia de suero de pacientes con DMAE seca, húmeda y de pacientes oftalmológicos sin ninguna patología oftalmológica degenerativa, diluido al 10% en el medio de cultivo. Como control se incubaron cultivos de 21 días con el propio medio de cultivo (sin suero) durante 7 días (*Figura 5*).

La extracción de las proteínas se realizó en tampón de lisis RIPA [150 mM de Cloruro Sódico, Triton X-100 al 1% (v/v), Deoxicolato Sódico al 0,5% (p/v), Dodecil Sulfato Sódico (SDS) al 0,1%, y 50mM de Tris pH 8 con inhibidores de proteasas 1:1000 (v/v)]. Para ello se realizó una disgregación mecánica, es decir, un raspado de la monocapa de células, se recogió el volumen total del pocillo, en el que se encontraban disueltas las proteínas, y se mantuvieron congeladas a -20°C.

Posteriormente, tras la descongelación de las muestras de proteínas, en un nuevo vial se añadieron 10 µl de la muestra, 10 µl de agua miliQ y 5 µl de β-mercaptoetanol 2X, que es el tampón de carga, cuya función es facilitar el desplazamiento de las proteínas por el gel. En cada pocillo del gel se cargó un volumen total de 25 µl.

2. Electroforesis (condiciones desnaturalizantes)

Se utilizó un gel de acrilamida/bis-acrilamida (12%) compuesto por un gel separador y un gel concentrador. Para delimitar los pocillos se utilizaron peines de 15 pocillos con 1,5 mm de espesor.

Una vez hecho el gel, se prepara la cubeta de electroforesis, se añade tampón de migración y se carga el gel. En cada uno de los geles se cargaron 3 muestras de proteínas extraídas de células cultivadas durante 7 días, 3 de 14 días y otras 3 de 21 días. Para ello, se centrifugaron y desnaturalizaron por calor (70°C durante 10 min) antes de la carga y se mantuvieron en hielo, para evitar la renaturalización de las proteínas. Los pocillos restantes se utilizaron para cargar el marcador de peso molecular.

La electroforesis se realizó a 90V constantes hasta que el frente de carga pasaba el gel concentrador y a 150V constantes a partir de ese momento, hasta que el frente recorría todo el gel.

3. Transferencia

Una vez finalizada la electroforesis, se coloca una membrana de PVDF sobre el gel, se introduce el soporte en la cubeta con tampón de transferencia y se deja transfiriendo toda la noche a 10V constantes en la cámara fría (4°C).

4. Preincubación

La membrana se preincuba en TBS-Tween (0,1%) - BSA (2%) durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. Después se obtienen fragmentos de la membrana utilizando como referencia las bandas del marcador de peso molecular para incubar cada fragmento de membrana con el anticuerpo primario de cada una de las proteínas a analizar.

5. Incubación con el anticuerpo primario

La incubación del anticuerpo primario se realizó en viales de 15 ml con 3 ml de TBS-Tween (0,1%) - BSA (2%) - Azida Sódica (0,05%) y la correspondiente concentración del anticuerpo primario (*Tabla 1*). Estos viales con las membranas se mantuvieron en rotación durante toda la noche a 4°C.

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Origen	Casa comercial	Dilución
E-cadherina	Ratón	Santa Cruz Biotechnologies	1:200 y 1:100
N-cadherina	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	1:200
CRB2	Conejo	Casero	1:100
β-tubulina	Conejo	Sigma-Aldrich	1:10000
β-actina	Ratón	Sigma-Aldrich	1:2500
CRB3	Conejo	Aviva Systems Biology	1:100
CRB3	Cabra	Aviva Systems Biology	1:100
α-SMA	Conejo	Abcam	1:100
Scrib	Cabra	Santa Cruz Biotechnologies	1:200 y 1:100
Scrib	Ratón	Santa Cruz Biotechnologies	1:100
Cit-18	Conejo	Abcam	1:50000
Snail	Cabra	Abcam	1:100
Claudina-19	Ratón	Novus	1:500
Ocludina	Ratón	Thermofisher	1:125
ZO-1	Ratón	Invitrogen	1:100
β-catenina	Cabra	Santa Cruz Biotechnologies	1:100
Vimentina	Ratón	Sigma-Aldrich	1:200

6. Incubación con el anticuerpo secundario

Posteriormente, se realizan 3 lavados de las membranas con TBS-Tween (0,1%) de 10 minutos cada uno. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó en cubetas separadas para cada uno de los animales de los que procedían los anticuerpos primarios, con 20 ml de TBS-Tween (0,1%), 5% de leche desnatada en polvo y la concentración correspondiente del anticuerpo secundario (*Tabla 2*). La incubación se realizó durante 50 minutos a temperatura ambiente en agitación.

Tabla 2: Anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo	Origen del anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución
HRP- Proteína A	Conejo	Thermofisher	1:7500
HRP- Proteína G	Ratón	Thermofisher	1:7500
α-Donkey-HRP	Cabra	Thermofisher	1:7500

7. Revelado

Se realizan 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween (0,1%) y se revela el resultado con una solución que contiene 2 volúmenes de agua miliQ, 1 volumen de luminol A y 1 volumen de luminol B, preparada en oscuridad. En la cámara oscura se colocan las películas radiográficas sobre la membrana dejándolas diferentes tiempos de exposición en función de la intensidad con la que aparezcan las bandas de las proteínas de interés.

8. Procesamiento de imágenes

Las películas se digitalizaron con un escáner utilizando el software EPSON Scan con el programa ArcSoft Scan-n-Stitch Deluxe. Posteriormente se realizaron las figuras de cada WB adaptando el brillo y el contraste de las bandas con Adobe Photoshop CS6® para cuantificarlas correctamente.

9. Cuantificación y análisis estadístico

Para la cuantificación se utilizó el programa ImageJ, que proporciona resultados sobre la intensidad de las bandas, y Excel, para comparar las bandas de cada proteína con las del control de carga en cuestión. El tratamiento estadístico de estos resultados se llevó a cabo mediante el programa informático SPSS 22.0. Para ello, se comprobó si los datos seguían una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk. Para los datos normales, se evaluó la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene; si las varianzas eran homogéneas, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor utilizando el test de Bonferroni como prueba post-hoc. En el caso de los datos de los estudios de DMAE, no se utilizó una prueba post-hoc tan restrictiva como Bonferroni, de manera que las diferencias se observaron mediante el test DMS, aunque los resultados de significación de ambas pruebas fueron muy similares. Para varianzas no homogéneas se realizó el test T3 de Dunnett. Para los datos no normales se realizó un ANOVA de 1 vía utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. En todos los casos se consideraron diferencias significativas aquellas cuyo $*p < 0,05$ y altamente significativas si $**p < 0,01$. Además, se representaron gráficamente los resultados.

4. Resultados

El trabajo se ha organizado en dos apartados: el objetivo de la primera parte ha sido establecer el patrón de expresión temporal de algunos de los marcadores proteicos que definen la madurez de cultivos de células de epitelio pigmentario humanas y en la segunda parte, estos marcadores se han utilizado para comprobar la hipótesis de partida, si el tratamiento de estos cultivos de EPR con suero de pacientes con DMAE produce o no un estado de transición epitelio-mesénquima. Por ello, dado que la utilidad de los marcadores vendrá determinada por su efectividad a la hora de definir un proceso de TEM en los cultivos celulares tratados con suero, analizaremos proteínas implicadas en los principales cambios morfológicos que ocurren en esta transición. Estos cambios son la alteración de las **uniones intercelulares**, la modificación de la **polaridad**, el dinamismo del **citoesqueleto** y los cambios en la **expresión génica**. Agruparemos los resultados en estas 4 categorías.

El análisis de los marcadores proteicos se realizó evaluando la cantidad de proteína presente en cultivos de células humanas de EPR a 7, 14 y 21 días (*Figura 5*). Resultados anteriores del laboratorio donde se ha realizado este TFG demuestran que tras 21 días en cultivo, las células presentan la morfología típica del epitelio pigmentario *in vivo*, así como la polaridad característica del mismo, de manera que se puede considerar establecida la monocapa de epitelio. Sin embargo, desde que las células se siembran hasta que se consigue la monocapa celular, se producen una serie de cambios en el cultivo a medida que las células crecen, se dividen y entran en contacto unas con otras: comienzan a formarse los primeros complejos de unión, se define la polaridad celular apicobasal, asociado a estos dos procesos se reorganiza el citoesqueleto y, consecuentemente, cambia la expresión génica. Por tanto, las categorías anteriormente establecidas también definen el proceso de formación de la monocapa de epitelio pigmentario en cultivo.

Para analizar y comparar la cantidad de proteína presente en las células en los diferentes días de cultivo, se realizaron experimentos de Western blot (WB). La comparación se realizó con valores de cantidad de proteína relativos, es decir, que la cantidad de cada proteína (intensidad de la banda correspondiente a una proteína en el WB) se dividió entre la cantidad de un **control de carga** presente en ese mismo cultivo, que es una proteína cuyo nivel de expresión se mantiene constante independientemente de las condiciones de estudio. Los controles de carga empleados en este trabajo han sido β -actina (42 KDa) y β -tubulina (55 KDa), en función del peso molecular de las proteínas a estudiar en cada WB. Ambas proteínas forman parte del citoesqueleto; la primera es una de las isoformas de la actina que forma parte de los microfilamentos de actina y la segunda forma heterodímeros con α -tubulina conformando los microtúbulos⁸. Sus niveles de expresión no varían en las condiciones de estudio, pero la cantidad de estas proteínas sí varía en relación con el número de

células que hay en cada cultivo, por lo que resulta necesario cargar la misma cantidad de proteína en cada pocillo del WB, equiparando de esta manera la cantidad de estas proteínas de referencia en los diferentes días de cultivo. El hecho de utilizar valores de expresión proteica relativos permite comparar los resultados de expresión de una proteína en cada una de las condiciones entre sí.

Estudios en cultivos celulares a 7, 14 y 21 días

→ Proteínas de uniones celulares

A medida que las células en cultivo maduran, van adquiriendo el fenotipo epitelial definitivo debido a que comienzan a establecer interacciones con las células vecinas. De esta manera, empiezan a desarrollarse complejos de unión estables. Las proteínas elegidas para analizar fueron:

E-cadherina: se trata de una proteína de la familia de las cadherinas que se expresa en las células epiteliales. Se seleccionó porque es una proteína transmembranal que establece interacciones por su extremo extracelular con otras cadherinas de células adyacentes formando uniones adherentes, mientras que, mediante su dominio citoplasmático, queda unida por complejos proteicos a los microfilamentos de actina del citoesqueleto. Por esta razón, parece lógico que pueda tener una expresión diferencial en los diferentes tiempos de cultivo, a medida que se desarrolla el epitelio y se forman las uniones. Además, es uno de los marcadores epiteliales más utilizados en la TEM, al reducir significativamente su expresión^{10,25,26}. El anticuerpo utilizado para determinar la expresión de E-cadherina (*Tabla 1*) reconoce al precursor (135KDa) y a la proteína madura (80-120KDa dependiendo del nivel de glicosilación). En los cultivos celulares no encontramos diferencias significativas de expresión del precursor ($p=0,447$; $n=10$); sin embargo, sí **observamos una reducción significativa de la expresión de la proteína madura** (80KDa es la forma predominante detectada) entre los 7 y los 21 días de cultivo ($p=0,031$; $n=11$) (*Figura 7*).

N-cadherina: es una proteína que establece interacciones homofílicas y heterofílicas con otras cadherinas, formando uniones adherentes. Las uniones entre N-cadherinas son más débiles que las interacciones entre E-cadherinas, por lo que se asocian con complejos de adhesión transitorios y fenotipos celulares móviles^{15,31}. Por esta razón, es posible que su expresión disminuya a medida que las células comienzan a perder su capacidad móvil y se establecen en la monocapa de epitelio (21 días en cultivo); a esto hay que añadir que se trata de un marcador mesenquimal muy utilizado en el estudio de la TEM (proceso en el que aumenta su expresión), por eso se propuso como marcador para analizar este proceso. Los resultados muestran una **disminución significativa de la cantidad de proteína** entre los 7 y los 14 días en cultivo ($p=0,013$; $n=4$), y altamente significativa entre los 7 y los 21 días de cultivo ($p=0,004$; $n=4$) (*Figura 7*).

β -catenina: forma parte de los complejos de adhesión al interactuar con el dominio intracelular de las cadherinas. Junto con α -catenina, asocian estos complejos a los filamentos de actina del citoesqueleto. Por tanto, su expresión aumentaría a medida que se desarrollan los complejos de adhesión. Sin embargo, cuando se encuentra libre puede actuar como regulador de la expresión génica, lo que podría interferir a la hora de utilizar esta proteína como marcador^{26,31}. Las bandas de WB de β -catenina aparecieron poco definidas y muestran una tendencia de disminución de la expresión, pero **las diferencias no son significativas** ($p=0,601$; $n=3$) (Figura 7).

Con el objetivo de estudiar proteínas implicadas en las uniones ocluyentes (importantes en la funcionalidad del EPR pues evitan filtraciones a través de los espacios intercelulares)⁸, se decidió estudiar la expresión de claudinas y ocludinas, que se unen a proteínas citoplasmáticas zónula ocludens (ZO) asociando estos complejos de unión a los filamentos de actina del citoesqueleto^{10,15}.

Ocludina: los resultados muestran una reducción de la cantidad de proteína presente en los diferentes días de cultivo, pero **las diferencias no son significativas** ($p=0,177$; $n=3$) (Figura 7).

Respecto a **Claudina-19** y a **ZO-1**, no se obtuvo un número estadísticamente aceptable de bandas de expresión proteica ($n \geq 3$) para cada una de las condiciones de análisis, por lo que estos datos no se han incluido en el presente trabajo.

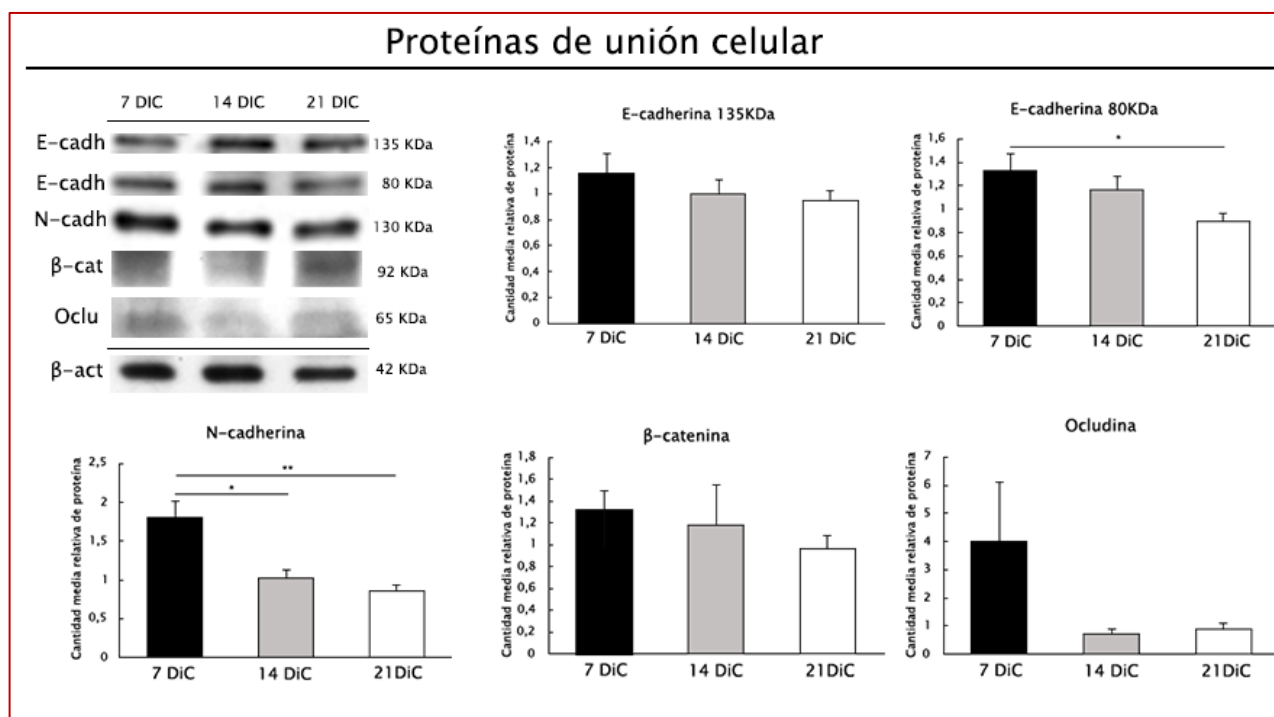


Figura 7. WB de proteínas de unión celular y gráficas de la cuantificación de la cantidad de proteína media relativa presente a los diferentes días de cultivo.

→ Proteínas de polaridad celular

Las células del EPR comienzan a establecer su polaridad apicobasal según aumentan los días en cultivo. La adquisición de esta polaridad está regulada por los complejos de polaridad mencionados anteriormente (1.1). En el presente trabajo se seleccionaron algunas de las proteínas que forman parte de ellos para conocer su expresión a lo largo del tiempo de cultivo:

CRB2: forma parte del complejo Crumbs de polaridad, esencial para el desarrollo del dominio apical.

A pesar de que no es un marcador proteico que se haya utilizado para el estudio de la TEM (según la bibliografía consultada), la modificación de la polaridad apicobasal de las células epiteliales hacia una polaridad delantera-trasera de las mesenquimales, lleva a pensar que podrían darse diferencias de expresión de esta proteína durante este proceso. El análisis de su expresión por WB muestra que en las células de EPR humanas hay un **incremento altamente significativo de la cantidad de CRB2** entre los 14 y los 21 días de cultivo ($p=0,005$; $n=3$) (Figura 8).

CRB3: también forma parte del complejo Crumbs pero su expresión en el EPR está menos explorada que la de CRB2¹⁶. Los datos de WB muestran que CRB3 experimenta una disminución en su expresión a los 14 días de cultivo y un aumento a los 21 días, alcanzando niveles similares a los de los 7 días; no obstante, **las diferencias no fueron significativas** ($p=0,052$; $n=16$) (Figura 8).

Scrib: forma parte del complejo de polaridad Scribble, implicado en la definición de la región basolateral de las células del epitelio pigmentario¹⁰. Además, participa en la regulación de la señalización de la TEM³², por lo que se propuso como marcador proteico para analizar este proceso. Sin embargo, en el desarrollo de la polaridad de las células de EPR humanas **no se obtuvieron diferencias de expresión significativas a lo largo de los días de cultivo analizados** ($p=0,638$; $n=5$) (Figura 8).

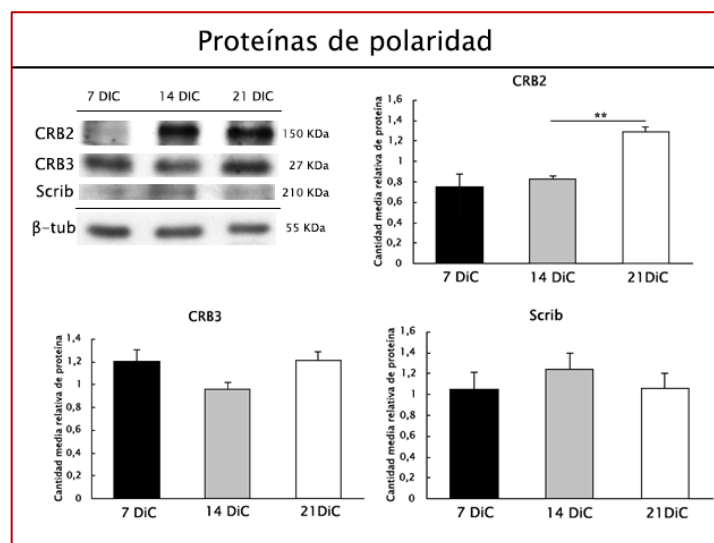


Figura 8. WB de proteínas de polaridad y gráficas de la cuantificación de la cantidad de proteína media relativa presente a los diferentes días de cultivo.

→ Proteínas del citoesqueleto

La composición de determinadas estructuras del citoesqueleto depende del fenotipo celular, lo que va a determinar la motilidad y la forma celular, entre otras características. Cuanto mayor sea la confluencia celular (mayor tiempo en cultivo), menor será la capacidad de movimiento de las células, y se delimitará su forma definitiva, por lo que se expresarán componentes propios del citoesqueleto del EPR a medida que se desarrolla el cultivo.

Citoqueratina-18: los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células epiteliales se caracterizan por estar formados por citoqueratinas, entre las que destaca la citoqueratina-18, que suele ser una de las más abundantes³³. A medida que se desarrolla el cultivo celular se espera que aumente su expresión ya que las células comienzan a establecer un fenotipo epitelial definitivo. Por otro lado, es un marcador epitelial muy utilizado en el estudio de la TEM²⁶. Los resultados del WB muestran una tendencia a aumentar la cantidad de esta proteína presente a lo largo de los días de cultivo, pero **estas diferencias no fueron significativas** ($p=0,890$; $n=4$) (*Figura 9*).

Vimentina: es el componente principal de los filamentos intermedios en las células mesenquimales. Los cambios asociados a la expresión de vimentina favorecen la motilidad celular^{15,25} de manera que, a medida que se conforma la monocapa y se define el fenotipo epitelial de las células en cultivo, se espera que su expresión disminuya. Además, es un marcador característico del estado mesenquimal muy utilizado en estudios de TEM^{26,28}. El análisis de esta proteína como marcador **no muestra diferencias significativas** ($p=0,754$; $n=3$) a pesar de que sí existe una tendencia de disminución de la cantidad de proteína a medida que se desarrolla el cultivo (*Figura 9*).

α -smooth muscle actin (α -SMA): es una de las isoformas de la actina y está implicada en la motilidad, estructura e integridad celular³⁴. Es una proteína característica (aunque no exclusiva) de miofibroblastos, que incorporan α -SMA en fibras de estrés incrementando su capacidad contráctil. Apenas se ha descrito en el EPR^{35,36}, pero es un marcador del estado mesenquimal muy utilizado en TEM²⁶. En las células de EPR en cultivo se observa un **incremento significativo de la presencia de α -SMA** entre los 7 y 14 días en cultivo ($p=0,015$; $n=4$), y altamente significativo entre los 7 y los 21 días ($p=0,000$; $n=4$) (*Figura 9*).

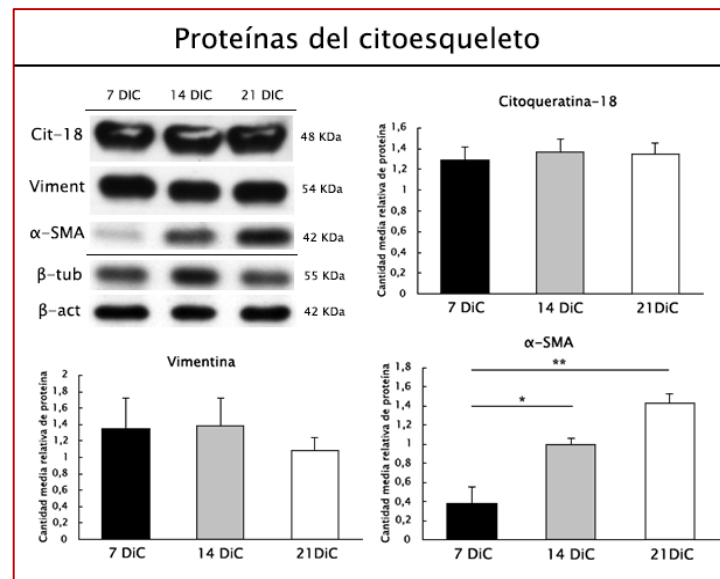


Figura 9. WB de proteínas del citoesqueleto y gráficas de la cuantificación de la cantidad de proteína media relativa presente a los diferentes días de cultivo.

→ Proteínas implicadas en la expresión génica

Los cambios morfológicos y de adquisición de madurez celular que ocurren a medida que se conforma la monocapa epitelial en cultivo, van necesariamente asociados a cambios en la expresión génica y están regulados por proteínas, principalmente factores de transcripción que actúan silenciando o promoviendo la expresión de determinados genes.

Snail: es un factor de transcripción que actúa como represor directo de E-cadherina al unirse a la región promotora del gen que la codifica (gen *CDH1*). Inhibe también la expresión de ocludinas, claudinas y citoqueratinas, y activa la expresión de N-cadherina y fibronectina, entre otras proteínas^{10,15,26,28}. Por tanto, es un marcador del estado mesenquimal muy utilizado en TEM²⁶ y en nuestro caso podría presentar una expresión diferencial en los cultivos. Se observa una **disminución significativa de Snail** entre los 7 y los 14 días en cultivo ($p=0,048$; $n=4$) y entre los 7 y los 21 días ($p=0,048$; $n=4$) (Figura 10).

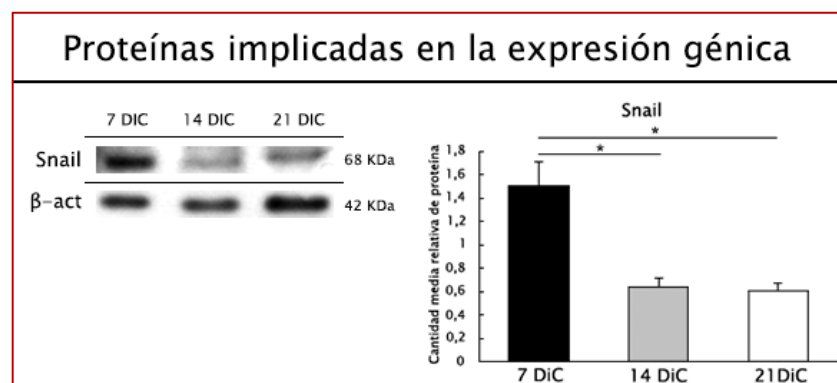


Figura 10. WB de proteínas implicadas en la expresión génica y gráficas de la cuantificación de la cantidad de proteína media relativa presente a los diferentes días de cultivo.

Estudios con sueros de pacientes con DMAE

En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior, los marcadores seleccionados para el análisis de los cambios proteicos indicativos de una transición epitelio-mesénquima en las células de EPR humanas en cultivo a 21 días, tras su tratamiento con suero de pacientes con DMAE o pacientes control, fueron: E-cadherina, N-cadherina, CRB2, Scrib, Citoqueratina-18, Vimentina y Snail. Aunque no todos estos marcadores mostraron diferencias significativas en los ensayos previos con células de EPR, se seleccionaron para las pruebas del estudio con suero de pacientes con DMAE por su relevancia en el proceso de transición epitelio-mesénquima que se cree podría tener lugar. Los resultados se muestran en la *Figura 11*.

Respecto a las proteínas de **unión celular**, se estudiaron **E-cadherina** y **N-cadherina**. Los niveles de E-cadherina no experimentaron cambios significativos entre los cultivos tratados con suero de pacientes con DMAE y los cultivos control ($p=0,269$; $n=6$). En el caso de N-cadherina, la cantidad de proteína fue ligeramente superior en las condiciones patológicas (células tratadas con suero de pacientes con DMAE) respecto a los controles, pero estas diferencias tampoco fueron significativas ($p=0,764$; $n=3$). Por tanto, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los dos marcadores de uniones celulares analizados.

Para analizar la posible alteración de la **polaridad celular** al tratar los cultivos celulares con los sueros de pacientes con DMAE se utilizaron las proteínas **CRB2** y **Scrib**. Los resultados de la expresión de CRB2 mostraron que sus niveles disminuyeron en los cultivos con suero de pacientes sin ninguna patología oftalmológica degenerativa en comparación con los cultivos control sin suero y que estas diferencias fueron altamente significativas ($p=0,003$; $n=3$). Además, se obtuvo un aumento altamente significativo de CRB2 en los cultivos tratados con suero de pacientes con DMAE seca frente a los pacientes control ($p=0,002$; $n=3$) y un aumento significativo entre los cultivos tratados con suero de pacientes con DMAE húmeda y los tratados con suero de pacientes control ($p=0,039$; $n=3$). Por otro lado, los datos de cantidad de proteína obtenidos para Scrib mostraron una reducción significativa de la proteína en el control con suero respecto a los cultivos sin suero ($p=0,018$; $n=4$) y un aumento significativo de los cultivos tratados con suero de pacientes con DMAE seca respecto al suero control ($p=0,013$; $n=4$). Además, los cultivos tratados con suero de pacientes con DMAE seca mostraron una expresión de CRB2 significativamente superior a la de los cultivos tratados con suero de DMAE húmeda ($p=0,047$; $n=4$).

Los marcadores seleccionados para el análisis de los posibles cambios en el **citoesqueleto** fueron **citoqueratina-18** y **vimentina**. La expresión de citoqueratina fue ligeramente superior en los cultivos tratados con sueros patológicos respecto al suero control, pero las diferencias no fueron significativas

($p=0,649$ para DMAE seca y $p=0,315$ para DMAE húmeda; $n=3$) y esta expresión fue inferior a la de los controles sin suero, pero las diferencias tampoco fueron significativas ($p=0,339$ y $p=0,687$, respectivamente; $n=3$). En el caso de vimentina, se encontró una menor expresión en los cultivos tratados con suero control que en las células sin suero y esta diferencia fue altamente significativa ($p=0,002$; $n=3$). La cantidad relativa de proteína es significativamente inferior en el caso de los cultivos tratados con suero de pacientes con DMAE húmeda respecto al control sin suero ($p=0,012$; $n=3$) y es significativamente superior en el caso del suero proveniente de pacientes con DMAE seca respecto a los pacientes control ($p=0,024$; $n=3$).

Finalmente, **Snail** se utilizó como marcador de los posibles cambios en la **expresión génica**. Los datos muestran un aumento significativo en los cultivos tratados con suero control respecto al blanco (sin suero) ($p=0,026$; $n=3$) y altamente significativo de las muestras tratadas con suero obtenido de pacientes con DMAE seca respecto al control sin suero ($p=0,002$; $n=3$). También se observaron diferencias significativas entre las muestras tratadas con suero de DMAE seca y húmeda ($p=0,040$; $n=3$) siendo menor la cantidad relativa de Snail en los cultivos tratados con suero obtenido de pacientes con DMAE húmeda.

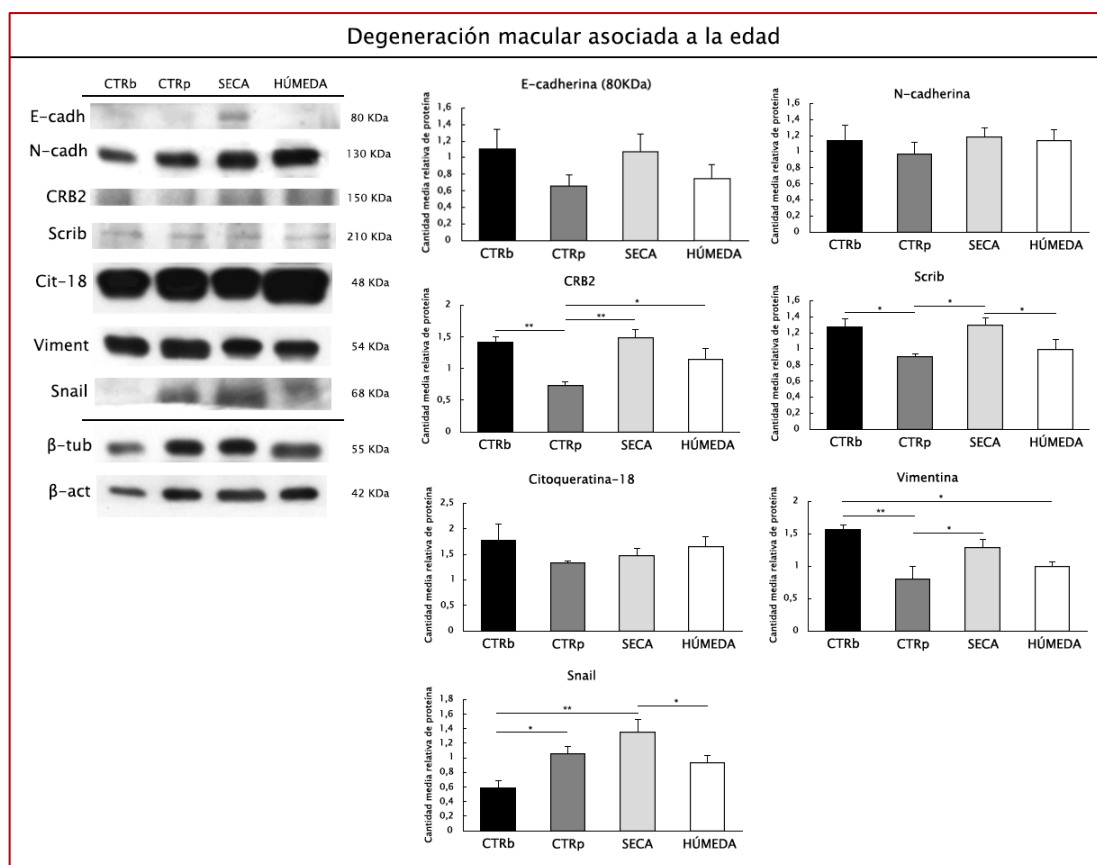


Figura 11. Gráficas de la cuantificación de la cantidad de proteína media relativa presente en las diferentes condiciones de análisis. Se muestran también las bandas de WB tanto de las proteínas como de los controles de carga. CTRb - cultivos control sin suero, CTRp – cultivos control tratados con suero de pacientes sin ninguna patología oftalmológica degenerativa, SECA - cultivos de 21 días tratados con suero de pacientes con DMAE seca y HÚMEDA – cultivos de 21 días tratados con suero de pacientes con DMAE húmeda.

5. Discusión

Estudios en cultivos celulares a 7, 14 y 21 días

El desconocimiento de los procesos que ocurren en las primeras etapas de la DMAE implica la necesidad de investigar cuáles podrían ser los mecanismos que se ven afectados con el objetivo de comprender aún mejor la patología y ser capaces de desarrollar protocolos de diagnóstico más tempranos y tratamientos más eficaces. Parece claro que los primeros cambios que se producen tienen lugar en el epitelio pigmentario de la retina, lo que provoca la degeneración de los fotorreceptores que dependen de las células dañadas, suponiendo una pérdida progresiva de la capacidad visual³⁵.

Son varias las hipótesis que se han planteado acerca de los cambios que pueden ocurrir en el EPR; desde que las células epiteliales podrían migrar dejando sin soporte estructural a los fotorreceptores y provocando su pérdida de funcionalidad y un proceso de fibrosis o neovascularización desencadenado por la respuesta al daño, hasta que las células del EPR podrían morir *in situ* con consecuencias similares. Sin embargo, cada vez son más las evidencias que sugieren que lo que ocurre es que las células epiteliales reaccionan a los cambios que se producen en el entorno diferenciándose hacia un nuevo fenotipo celular, lo que provoca la alteración de sus funciones y, consecuentemente, el desarrollo de la patología³⁵.

En base a estas evidencias, se plantea la hipótesis de que las células del EPR podrían sufrir un proceso de TEM, adquiriendo un nuevo fenotipo (mesenquimal) lo que implica la pérdida de la funcionalidad de la monocapa de epitelio en la zona afectada. Se sabe que la TEM puede desencadenarse en respuesta al microambiente celular, por lo que situaciones como la hipoxia, la respuesta inmunológica o los bajos niveles de nutrientes en el epitelio, provocados por la aparición de drusas entre el EPR y la MB, podrían ser los factores desencadenantes de la transición fenotípica¹⁰.

Para comprobar esta hipótesis, es necesario caracterizar y seleccionar en los cultivos celulares marcadores proteicos que puedan ser representativos en esta transición fenotípica, para lo que, en el presente trabajo, se planteó realizar **un análisis de los cambios en la expresión proteica de marcadores de la TEM a lo largo del proceso de desarrollo de cultivos de células de epitelio pigmentario humanas**, que podría asemejarse al cambio fenotípico reverso. A pesar de que no podemos hablar de una transición mesénquima-epitelio propiamente dicha, debido a la naturaleza epitelial de las células en cultivo, el proceso que se analiza al estudiar proteínas de células a 7, 14 y 21 días de cultivo, se asemeja a esta transición. Esto se debe a que las células a los 7 días de cultivo presentan una morfología y unas capacidades de motilidad y proliferación que podrían recordarnos a las de las células mesenquimales, mientras que, a medida que pasan los días en cultivo, van adquiriendo un fenotipo epitelial definitivo, que prácticamente se conseguiría a los 21 días, cuando

se ha establecido en estudios anteriores en el laboratorio donde se realizó este TFG que el cultivo adquiere su polaridad definitiva, propia del epitelio pigmentario.

Una de las principales características que definen un tejido epitelial son las **uniones entre células adyacentes**. Las células epiteliales forman complejos de unión estables que son esenciales para conservar el fenotipo epitelial y que, al mismo tiempo, contribuyen a mantener la quiescencia mitótica propia del EPR gracias a una inhibición por contacto célula-célula³⁷. Por esta razón, resultaría lógico que las proteínas que forman parte de los complejos de unión del epitelio pigmentario aumentaran su expresión progresivamente desde los 7 hasta los 21 días en cultivo. Sin embargo, las proteínas **Ocludina** y **β-catenina** no mostraron una expresión diferencial significativa, y para **ZO-1** y **Claudina-19** no se obtuvieron datos suficientes para realizar un análisis cuantitativo, por lo que no se incluyeron en el estudio.

E-cadherina forma parte de los anillos de adhesión (zónula adherente)⁸ de las células epiteliales; sin embargo, el EPR es un epitelio muy particular, pues presenta propiedades que no son típicas de la mayoría de los epitelios; por ejemplo, está localizado entre los fotorreceptores y la coroides, en lugar de quedar enfrente a un lumen³⁸. Otra de estas características diferenciales, es que el EPR humano expresa otras cadherinas como P-cadherina, cuyas propiedades morforreguladoras son menos conocidas, que podría sustituir a E-cadherina en la formación de los complejos de adhesión⁸. Esto explicaría por qué se produce una reducción de la cantidad de esta proteína en los cultivos celulares a los 14 y 21 días (*Figura 7*). El predominio de esta isoforma en detrimento de la E-cadherina podría ser transitorio, pues se sabe que ambas isoformas se expresan en las células del epitelio pigmentario. De hecho, en las células de EPR en cultivo, la expresión de E-cadherina es tardía, pues comienza a expresarse poco después de que se alcance la confluencia celular, momento en el que aparecen cambios fenotípicos prominentes. Esta confluencia celular permite establecer un estado quiescente debido a la inhibición por contacto del crecimiento y la motilidad celular, y a las uniones adherentes mediadas por cadherinas, que se vuelven más estables^{37,38}. Además, E-cadherina aparece primero en parches y posteriormente aumenta su distribución formando un anillo de adhesión al reorganizarse gracias al citoesqueleto de actina³⁹. Por tanto, es a partir de los 21 días en cultivo cuando deberían apreciarse esos cambios más significativos en la expresión de E-cadherina, aumentando su expresión, a diferencia de lo que ocurre hasta los 21 días de cultivo. Debido a que los experimentos con suero de pacientes con DMAE se realizaron durante 7 días más a partir de esos 21 días en cultivo en los que ya se ha alcanzado la confluencia celular y se puede hablar de un fenotipo epitelial pigmentario, y dado que E-cadherina es uno de los principales marcadores proteicos utilizados en el estudio de la TEM, se utilizó en el análisis posterior como marcador epitelial.

N-cadherina está implicada en la formación de contactos adherentes más transitorios que permiten la migración celular por lo que, a pesar de que la expresión de N-cadherina en el EPR también sea algo mayor que en otros epitelios³⁸, se reduce su expresión de manera significativa a medida que las células van conformando la monocapa epitelial. Esto es acorde con la reducción de su capacidad de movimiento ya que las células comienzan a ocupar posiciones fijas en el cultivo y forman uniones intercelulares estables.

Al tiempo que se conforman las uniones gracias a los primeros contactos entre células, éstas comienzan a expresar **complejos de polaridad** que empiezan a definir 3 regiones diferenciadas: apical, lateral y basal. La integridad y la función de los tejidos epiteliales dependen tanto del establecimiento de las uniones célula-célula como de la polaridad³⁹, por lo que, en un proceso de formación del epitelio, las proteínas que conforman los complejos de polaridad deberían incrementar su expresión. Este es el caso de **CRB2** (*Figura 8*), que aumenta su expresión de manera significativa en los estadios más avanzados del cultivo. Esta proteína resulta interesante ya que no es un marcador proteico utilizado en el estudio de la TEM.

Por su parte, **CRB3**, a diferencia de CRB2, que es una proteína que se ha caracterizado en el EPR, está menos estudiada en este tejido¹⁶. CRB3 se expresa de manera ubicua en todos los epitelios¹⁷, pero en el EPR, al tratarse de un epitelio especial, se desconoce su nivel de expresión. Además, a pesar de que se ha descrito la coexpresión de varios miembros de la familia de proteínas CRB en una misma célula, se desconoce si podría darse algún tipo de interacción entre CRB2 y CRB3 en el EPR¹⁶. A pesar de ello, los resultados de la cantidad de CRB3 presente en las células en los diferentes días de cultivo no muestran diferencias significativas, por lo que se descartó para su empleo como marcador diferencial en el estudio del tratamiento de cultivos celulares con suero de pacientes con DMAE.

En el caso de **Scrib** ocurre algo similar. Esta proteína resulta esencial en el establecimiento del fenotipo epitelial al formar parte del complejo Scribble, que actúa definiendo la polaridad basolateral³⁹. Sin embargo, no se conoce su expresión en el epitelio pigmentario. Los resultados del presente trabajo muestran una tendencia al alza de la presencia de la proteína a los 14 días que parece estabilizarse a los 21 días en cultivo, aunque estas diferencias no fueron significativas. A pesar de ello, como parece haber una tendencia al aumento debido a la definición de la polaridad celular a medida que se desarrolla el cultivo, se optó por utilizar también esta proteína en el análisis de los cambios celulares tras el tratamiento con los sueros de los pacientes. Esta decisión se tomó teniendo en cuenta que se reprime la expresión de Scrib en la TEM por lo que podría ser un marcador adecuado en el estudio posterior¹⁵.

Por otro lado, la forma de las células del epitelio es mantenida por los **componentes del citoesqueleto**. Llegados a este punto, es necesario tener en cuenta que la principal dificultad que nos podemos encontrar *in vitro* cuando trabajamos con cultivos polarizados es que hay una alta probabilidad de cambio en la morfología celular durante el cultivo, lo que se puede reflejar en diferencias en determinados componentes del citoesqueleto⁴⁰.

Uno de estos componentes son los filamentos intermedios, cuya composición proteica varía en función del tipo celular. En el caso del EPR, las proteínas más abundantes son las citoqueratinas, concretamente en el epitelio pigmentario humano predominan la citoqueratina-8 y la citoqueratina-18⁸. A medida que se desarrolla el epitelio en cultivo, apenas cambiará la composición proteica de los filamentos intermedios puesto que el fenotipo de las células que se siembran en cultivo es epitelial. Esto es lo que se observa en los resultados con **citoqueratina-18** (*Figura 9*), pues no aparecen diferencias significativas entre los diferentes días de cultivo. El ligero incremento de la cantidad de proteína que se puede apreciar, probablemente se debe al crecimiento en tamaño de las células a medida que se establece el cultivo, cambio que ocurre especialmente en estadios intermedios (14 días). En este caso, la ausencia de datos significativos nos indica que las células en cultivo con fenotipo epitelial presentan esta proteína como componente de los filamentos intermedios, mientras que, si se produce un cambio fenotípico hacia células mesenquimales, su expresión podría verse reducida en favor de la expresión de otra proteína como vimentina.

Se conoce desde hace tiempo que las células del EPR humano expresan la proteína **vimentina**⁸. A pesar de que no se observaron diferencias significativas de expresión, se aprecia una ligera disminución de la cantidad de proteína (*Figura 9*) que podría deberse a que, al inicio del cultivo, las células presentan mayor movilidad mientras que, a medida que éste madura, las células van definiendo su posición y pierden su capacidad móvil, por lo que serían las citoqueratinas las que sustituirían a vimentina, aunque no del todo; esto también podría explicar el ligero incremento de la cantidad relativa de citoqueratina-18 que mencionábamos anteriormente. Además, en las primeras etapas del cultivo, las células pueden desarrollar prolongaciones transitorias del citoesqueleto con el objetivo de establecer contactos con células vecinas, lo que podría explicar por qué la cantidad de vimentina no se reduce entre los 7 y los 14 días en cultivo, sino que es prácticamente la misma en estas primeras etapas. Igual que en el caso de la citoqueratina-18, no vemos una expresión diferencial significativa, pero el cambio fenotípico de las células hacia un fenotipo mesenquimal se reflejaría en un aumento significativo de la expresión de vimentina al tiempo que se reduce la de citoqueratinas. Esto se debe a que en el proceso de transición epitelio-mesénquima, la proteína vimentina reemplaza a los filamentos intermedios de citoqueratina para favorecer la motilidad^{8,25}.

En relación con α -SMA, las células del epitelio pigmentario de la retina humana tienen una expresión basal de esta proteína³⁶, por lo que puede aparecer en las células en cultivo. No obstante, su expresión no es tan importante como podría ser en otros tipos celulares como en los miofibroblastos, que se caracterizan por presentar una capacidad contráctil necesaria para su función y que consiguen gracias a la incorporación de α -SMA en fibras de estrés de actina^{35,36}. A medida que se desarrolla el epitelio en cultivo se podría pensar que, en caso de que esta proteína promueva la motilidad y capacidad contráctil de las células en cultivo, su expresión disminuirá a medida que las células comienzan a ocupar posiciones fijas en la monocapa epitelial. Sin embargo, los resultados son completamente opuestos, pues se observa un incremento altamente significativo de la cantidad de proteína respecto a la situación inicial (*Figura 9*). Como ya se ha mencionado, los microfilamentos de actina tienen como función principal el mantenimiento de la forma celular, el movimiento, la división y el tráfico vesicular. Estas propiedades celulares son especialmente dinámicas a medida que se establece un cultivo. Por esta razón, lo que ocurre *in vitro* durante la confluencia celular temprana es que los filamentos de actina se organizan de manera lineal en fibras de estrés o bandas circunferenciales incompletas, generalmente desplazadas del perímetro celular³⁷. Estas fibras de estrés de actina incorporan α -SMA, lo que explicaría el porqué de un aumento altamente significativo de la cantidad de proteína presente a medida que se desarrolla el cultivo. Posteriormente, los microfilamentos de actina se distribuirían en haces circunferenciales estrechamente asociados a los límites celulares, tal y como aparecen en el tejido *in vivo*^{36,37}. En este caso, a pesar de haber encontrado diferencias significativas, no se seleccionó como marcador proteico para los análisis posteriores puesto que esta proteína aumenta en la TEM (se usa como marcador mesenquimal) y en el proceso que estamos considerando como opuesto, también aumentaba.

Finalmente, a nivel de **expresión génica**, el único marcador utilizado fue el factor de transcripción **Snail**. En relación con esta proteína, cabe destacar que no se ha caracterizado en el EPR. Sin embargo, se sabe que en este factor de transcripción convergen varias rutas de señalización que promueven el desarrollo del fenotipo mesenquimal por lo que, en una situación en la que se está conformando una monocapa epitelial, la cantidad de esta proteína presente en cultivo debería disminuir¹⁷. Esto es lo que se observa en los resultados obtenidos (*Figura 10*), una reducción significativa de la cantidad relativa de la proteína respecto de la situación inicial, por lo que se seleccionó como marcador mesenquimal en los análisis posteriores de cultivos de EPR tratados con suero de pacientes con DMAE.

Estudios con sueros de pacientes con DMAE

El estudio de una situación patológica *in vitro* supone un reto a la hora de conseguir mimetizar, en la medida de lo posible, las condiciones y factores del microentorno celular que pueden verse afectados *in vivo*. En el caso de la DMAE, las células del epitelio pigmentario de la retina ven afectada su fisiología debido a la presencia de drusas que dificultan el intercambio de nutrientes y desechos con la sangre. Esto provoca un daño que desencadena la liberación de mediadores inflamatorios por las propias células epiteliales, que llegan a la sangre con el objetivo de reclutar y activar células inflamatorias, endoteliales y fibroblastos. Estas células migran a la zona dañada y proliferan para cubrir y regenerar el tejido dañado. Por tanto, existen multitud de factores de crecimiento y citoquinas que pueden estar presentes en el entorno dañado entre los que se incluyen TGF- β (factor de crecimiento transformante β), FGF (factor de crecimiento fibroblástico) y EGF (factor de crecimiento epidérmico), entre otros^{36,41}. Estos compuestos pueden encontrarse en la sangre o ser secretados directamente en la zona dañada y pueden inducir la TEM en el epitelio pigmentario de la retina. Por esta razón, se expusieron los cultivos celulares de 21 días (monocapa de epitelio pigmentario establecida) a medios de cultivo con un 10% de suero de pacientes con DMAE seca y húmeda; y de pacientes sin patologías oftalmológicas degenerativas como control.

Al contrario que en el apartado anterior, el proceso a estudiar utilizando los marcadores proteicos seleccionados es una posible **transición epitelio-mesénquima** desencadenada por componentes presentes en el suero sanguíneo, lo que se reflejaría en un cambio en la expresión proteica de los cultivos celulares obteniéndose un perfil proteico similar al de un fenotipo mesenquimal. El proceso de TEM es el resultado de la acumulación de cambios parciales, por lo que no todos los cambios se producirán a la vez y unos desencadenarán la sucesión de otros¹⁸.

En la TEM las **uniones celulares** comienzan a degradarse, lo que permite un aumento de la movilidad y de la capacidad de proliferación celular. La disolución de los complejos de unión va acompañada de la disminución de la expresión de los componentes proteicos que los forman. Por ejemplo, E-cadherina es internalizada y degradada²⁵ al tiempo que comienza a reprimirse su expresión. Además, se produce un cambio en la expresión de las isoformas de las cadherinas, de E- y P-cadherina, a N-cadherina, que forma complejos de adhesión transitorios que permiten la migración celular^{10,36}. El hecho de que no se observen diferencias en la cantidad de las cadherinas estudiadas (*Figura 11*) podría deberse a que las uniones adherentes son los últimos complejos de unión en degradarse. Además, no podemos olvidar que los análisis por WB reflejan la cantidad de proteína presente en el cultivo celular, pero el hecho de que una proteína esté presente en la célula no implica

necesariamente que esté realizando su función; podría estar ubiquitinada o modificada de otra manera para su degradación o reciclaje, o podría estar implicada en una función diferente.

Esta reducción de los complejos de unión incrementa la movilidad celular, pero para que la migración celular sea direccional, las células que sufren TEM reprimen la expresión de **complejos proteicos de polaridad** como Crumbs y Scribble¹⁵. Los resultados preliminares obtenidos para los complejos de polaridad son sorprendentes (*Figura 11*), pues tanto para CRB2 como para Scrib la cantidad de proteína media relativa es mayor en los cultivos patológicos respecto al control con suero (excepto Scrib en DMAE húmeda). No obstante, apenas se ha definido el papel de CRB2 en el proceso de TEM, y Scrib podría participar en la polaridad trasero-delantera de las células mesenquimales³⁹, por lo que es difícil extraer conclusiones de estos resultados. Además, en ambos casos se da una reducción significativa de la cantidad de proteína en los cultivos control con suero respecto del control sin suero.

Por otra parte, el **citoesqueleto** de las células que sufren TEM muestra una reorganización característica para aumentar la contractilidad y la movilidad celular. Se produce un aumento de la distribución de actina en fibras de estrés, que son estructuras dinámicas de filamentos de actina y proteínas asociadas, con funciones importantes en la motilidad celular y en la capacidad contráctil, y la sustitución de los filamentos intermedios de citoqueratina por vimentina, que regulan el tráfico de orgánulos y proteínas asociadas a membrana^{15,26}. Además, se producen cambios morfológicos gracias a la formación de proyecciones de membrana que reciben el nombre de filopodios y lamelipodios, gracias a cambios dinámicos en la organización de la actina. En la región delantera se promueve la polimerización de la actina y la formación de protrusiones de membrana mientras que en la región trasera se promueve el desmontaje de los complejos de adhesión y la retracción celular^{10,15,28}. Los resultados obtenidos de citoqueratina-18 no muestran diferencias significativas (*Figura 11*); pero en el caso de vimentina, sí se observa un aumento significativo de la cantidad de proteína en los cultivos patológicos de DMAE seca respecto de los cultivos de pacientes control, lo que apoya la hipótesis de que ocurre el cambio fenotípico hacia un estado mesenquimal siendo los cambios en la motilidad celular los primeros en aparecer.

Por último, en las células que atraviesan por un proceso de TEM se dan cambios en los programas de señalización que definen la forma celular y reprograman la **expresión génica** provocando, como se ha comentado, la disminución de la expresión de proteínas de unión celular y la activación de genes que promueven cambios en el citoesqueleto y en la migración celular¹⁰. En esta reprogramación génica participan factores de transcripción como SNAIL, SLUG o TWIST²⁶. La contribución de cada uno de los factores de transcripción implicados en el proceso depende del tipo celular, pero, en cualquier caso, se da una cooperación y una convergencia de las diferentes rutas desencadenantes en

dianas específicas¹⁵. Para el caso concreto del factor de transcripción Snail, éste se encuentra sobreexpresado a medida que se produce la TEM en gran variedad de tipos celulares^{18,25}. Los resultados preliminares obtenidos muestran un aumento significativo de la expresión de Snail respecto de los cultivos control sin suero (*Figura 11*) y un ligero incremento en el caso de los cultivos tratados con suero de pacientes con DMAE seca respecto del control con suero (aunque no es significativo), lo que concuerda con la posibilidad de que se dé una transición epitelio-mesénquima en este proceso patológico.

Finalmente, cabe mencionar que la lámina basal del epitelio es esencial para el mantenimiento de su integridad y fisiología, y en la TEM tiene lugar una degradación y remodelación de ésta por las propias células que adquieren el fenotipo mesenquimal^{15,28}. Además, existen diferentes señales autocrinas que se integran para inducir la transición²⁸, por lo que podría ser interesante **analizar los posibles componentes que puedan secretar las células epiteliales al medio de cultivo**.

Es difícil extraer conclusiones definitivas en base a los resultados obtenidos, puesto que apenas se han encontrado diferencias significativas marcadas entre las condiciones patológicas y las condiciones control, pero podría ocurrir que los 7 días de tratamiento de los cultivos con suero no fueran suficientes para observar todas las diferencias propuestas a analizar.

No obstante, parece claro que el uso de cultivos de células humanas de epitelio pigmentario de la retina ofrece la posibilidad de analizar al detalle la morfología, funciones y propiedades moleculares de esta monocapa bajo condiciones normales y patológicas, lo que resultaría complicado de hacer *in vivo*. Sin embargo, los cultivos celulares, como sistema artificial que son, presentan una serie de desventajas que pueden afectar a los resultados ya que no se encuentran en su microentorno nativo, y las células *in vitro* pueden activar el ciclo celular, alterar la diferenciación, el comportamiento, la senescencia y sufrir procesos de apoptosis debido a las condiciones de cultivo⁴⁰. Por esta razón, los resultados que se pueden desprender de nuestro estudio no son definitivos ni ofrecen una respuesta clara a la hipótesis de partida planteada. Se trata de resultados preliminares que se deben ampliar aumentando el número de réplicas de los experimentos y variando las condiciones de análisis (% de suero o tiempo de tratamiento). Además, se deben complementar con otros ensayos proteómicos y de expresión génica, así como con los resultados de otras técnicas como la inmunofluorescencia que puede proporcionar datos relevantes sobre la morfología celular y la localización de los marcadores proteicos en las células. La evaluación de todos estos datos en conjunto contribuirá al esclarecimiento de algunos de los interrogantes que siguen planteando patologías oculares como la degeneración macular asociada a la edad, obteniéndose respuestas esenciales para el desarrollo de tratamientos más eficaces que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes que las sufren.

6. Conclusiones

En los últimos años, el estudio de la transición epitelio-mesénquima ha avanzado considerablemente, permitiendo explicar algunos de los procesos tanto fisiológicos como patológicos en los que participa. Este aliciente ha permitido abordar muchos planteamientos desde nuevas perspectivas al poder considerar que el fenotipo epitelial tiene una plasticidad inherente por lo que puede ser modificado en respuesta a numerosos factores. Como ejemplo de estos nuevos planteamientos encontramos nuestra hipótesis de partida, pues los mecanismos moleculares que desencadenan los primeros estadios de la degeneración macular asociada a la edad podrían explicarse mediante este proceso biológico.

- Gracias a este trabajo se ha conseguido proponer un modelo patológico de células humanas de epitelio pigmentario de la retina, para el estudio de los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en el desarrollo de las primeras etapas de la DMAE.
- La selección de marcadores epiteliales y mesenquimales llevada a cabo en este estudio ayudó a caracterizar el modelo celular definido para los estudios patológicos, lo que permite asegurar que se trata de un modelo experimental adecuado al ser representativo del tejido *in vivo*.
- Los resultados obtenidos permiten demostrar que es bastante probable que ocurra el cambio fenotípico de las células del epitelio pigmentario de la retina al estar sometidas al entorno patológico característico de las primeras etapas de la DMAE.
- Estos resultados ofrecen perspectivas prometedoras respecto a la utilización de este modelo patológico para realizar experimentos adicionales que permitan complementar estos resultados preliminares.

7. Bibliografía

1. Kolb, H., Fernandez, E. & Nelson, R. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* (University of Utah Health Sciences Center, 1995).
2. Silverthorn, D. & Johnson, B. *Fisiología humana: Un enfoque integrado*. (Editorial Médica Panamericana, 2014).
3. Cruz, R. TEORÍA DEL COLOR. *Un mundo lleno de arte* (2018). Disponible en: <http://cruzvillachica.blogspot.com/2018/12/teoria-del-color.html>. (Acceso: 4 de mayo de 2019)
4. Cheng, C. Y. *Biology and Regulation of Blood-Tissue Barriers*. 763, (Springer, 2013).
5. Bhutto, I. & Luty, G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol. Aspects Med.* 33, 295–317 (2012).
6. Strauss, O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol. Rev.* 85, 845–881 (2005).
7. Lehmann, G. L., Benedicto, I., Philp, N. J. & Rodriguez-Boulan, E. Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: past, present and future. *Exp. Eye Res.* 126, 5–15 (2014).
8. Bonilha, V. L. Retinal pigment epithelium (RPE) cytoskeleton in vivo and in vitro. *Exp. Eye Res.* 126, 38–45 (2014).
9. Rizzolo, L. J. Development and Role of Tight Junctions in the Retinal Pigment Epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 258, 195–234 (2007).
10. Troncoso, D. *et al.* Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. *Univ. Médica* 58, 1–10 (2017).
11. Kay, P., Yang, Y. C. & Paraoan, L. Directional protein secretion by the retinal pigment epithelium: Roles in retinal health and the development of age-related macular degeneration. *J. Cell. Mol. Med.* 17, 833–843 (2013).
12. Marmorstein, A. D. The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic* 2, 867–872 (2001).
13. Apodaca, G., Gallo, L. I. & Bryant, D. M. Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry. *Nat. Cell Biol.* 14, 1235–1243 (2012).
14. Assémat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A. & Massey-Harroche, D. Polarity complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 614–630 (2008).
15. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196 (2014).
16. Paniagua, A. E. *et al.* CRB2 completes a fully expressed Crumbs complex in the Retinal Pigment Epithelium. *Sci. Rep.* 5, 1–11 (2015).
17. Wang, Q. & Margolis, B. Apical junctional complexes and cell polarity. *Kidney Int.* 72, 1448–1458 (2007).
18. Tamiya, S. & Kaplan, H. J. Role of epithelial - mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Exp. Eye Res.* 142, 26–31 (2016).
19. Fine, S. L., Berger, J. W., Maguire, M. G. & Ho, A. C. Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 342, 483–492 (2000).
20. Jager, R. D., Mieler, W. F. & Miller, J. W. Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 358, 2606–2617 (2008).
21. Ambati, J. & Fowler, B. J. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 75, 26–39 (2012).
22. Ohlmann, A., Scholz, M., Koch, M. & Tamm, E. R. Epithelial-mesenchymal transition of the retinal pigment epithelium causes choriocapillaris atrophy. *Histochem. Cell Biol.* 146, 769–780 (2016).
23. Leading cause of blindness - What Is Diabetic Retinopathy: Symptoms & Treatment. *DKRS GROUP* (2018). Disponible en: <https://dkrsgroup.org/decor/leading-cause-of-blindness-what-is-diabetic-retinopathy-symptoms-amp-treatment/>. (Acceso: 6 de mayo de 2019)

24. Kalluri, R. & Weinberg, R. a. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428 (2009).
25. Huang, R. Y.-J., Guilford, P. & Thiery, J. P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* 125, 4417–4422 (2012).
26. Serrano-Gomez, S. J., Maziveyi, M. & Alahari, S. K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol. Cancer* 15, 1–14 (2016).
27. Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 69–84 (2019).
28. Gonzalez, D. M. & Medici, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* 7, 1–17 (2014).
29. Pfeiffer, B. A. & Philp, N. J. Cell culture of retinal pigment epithelium: Special Issue. *Exp. Eye Res.* 126, 1–4 (2014).
30. Segurado, A. *Análisis del establecimiento de las uniones intercelulares del epitelio pigmentario de la retina humana y su relación con las proteínas de polaridad celular 'CRB'*. TFM - Universidad de Salamanca, (2016).
31. Derycke, L. D. M. & Bracke, M. E. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 463–476 (2004).
32. Elsum, I. A., Martin, C. & Humbert, P. O. Scribble regulates an EMT polarity pathway through modulation of MAPK-ERK signaling to mediate junction formation. *J. Cell Sci.* 126, 3990–3999 (2013).
33. McKechnie, N. M., Boulton, M., Robey, H. L., Savage, F. J. & Grierson, I. The cytoskeletal elements of human retinal pigment epithelium: in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 91, 303–312 (1988).
34. Zhang, Y. *et al.* Protective Effects of Fucoïdan on Epithelial-Mesenchymal Transition of Retinal Pigment Epithelial Cells and Progression of Proliferative Vitreoretinopathy. *Cell. Physiol. Biochem.* 46, 1704–1715 (2018).
35. Guidry, C., Medeiros, N. E. & Curcio, C. A. Phenotypic Variation of Retinal Pigment Epithelium in Age-Related Macular Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 267–273 (2002).
36. Ishikawa, K., Kannan, R. & Hinton, D. R. Molecular mechanisms of subretinal fibrosis in age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 142, 19–25 (2016).
37. Kaida, M., Cao, F., Skumatz, C. M. B., Irving, P. E. & Burke, J. M. Time at confluence for human RPE cells: Effects on the adherens junction and in vitro wound closure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3215–3224 (2000).
38. Burke, J. M., Cao, F., Irving, P. E. & Skumatz, C. M. B. Expression of E-cadherin by human retinal pigment epithelium: Delayed expression in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 2963–2970 (1999).
39. Rodriguez-Boulán, E. & Macara, I. G. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 225–242 (2014).
40. Kuznetsova, A. V., Kurinov, A. M. & Aleksandrova, M. A. Cell Models to Study Regulation of Cell Transformation in Pathologies of Retinal Pigment Epithelium. *J. Ophthalmol.* 2014, 1–18 (2014).
41. Lee, S. C. *et al.* Epitheliomesenchymal transdifferentiation of cultured RPE cells. *Ophthalmic Res.* 33, 80–86 (2001).